

# ISOLASI GENISTEIN DARI TEMPE SECARA KROMATOGRAFI

Wuryani

Puslitbang Kimia Terapan - LIPI  
Kawasan PUSPIPTEK, Serpong 15310

## INTISARI

Keberadaan genistein dalam tempe dapat dideteksi dengan menggunakan berbagai teknik kromatografi seperti Kromatografi Lapis-Tipis (KLT), Kolom dan Cairan Kinerja Tinggi (KCKT). Pada penelitian ini, isolasi dan pemurnian genistein dari tempe telah dilakukan secara KLT. Analisa secara spektrofotometri dan spektrometri massa, penyemprotan dengan reagen kromogenik serta hidrolisis dilakukan untuk mengidentifikasi genistein. Kuantifikasi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer, dan diperoleh bahwa 100g tempe yang dibuat di laboratorium mengandung 13,80 mg genistein.

## ABSTRACT

The presence of genistein in tempe (fermented soybean) could be detected by using various chromatographic techniques, such as Thin-Layer, Column and High Pressure Liquid Chromatography. In this experiment, TLC was chosen for the isolation and purification of genistein from tempe. Spectrophotometry, Mass Spectrometry, spraying with chromogenic reagents and hydrolysis were carried out for identifying genistein. Quantification was carried out spectrophotometrically and it was shown that the laboratory prepared tempe (100 g) contained 13.80 mg of genistein.

## PENDAHULUAN

Genistein dikenal mempunyai berbagai sifat, seperti misalnya oestrogenik (1) dan antioksidan (2). Akhir-akhir ini, beberapa peneliti dari Jerman melaporkan bahwa genistein mampu menghentikan pertumbuhan kapiler darah yang baru. Penelitian masih terus dilanjutkan untuk menguji apakah senyawa yang termasuk kedalam kelompok isoflavonoid ini juga dapat mencegah perkembangan kanker.

Isolasi genistein beserta turunannya 7-O-glukosida genistein dari kedelai, pertama kali dilakukan oleh Walter (3). Menyusul Nash *et al* (4) melaporkan kemudian bahwa kedua senyawa ini terdapat pula dalam produk kedelai lainnya yaitu konsentrat protein kedelai, kedelai bebas lemak dan *soy flakes* (5). Sedangkan Farmakalidis dan Murphy (6) menemukannya dalam *toasted, defatted soy flakes*.

Berbagai teknik kromatografi telah digunakan untuk melakukan analisis kualitatif genistein dalam tempe. Misal-

nya György *et al.* (7) menggunakan sistim kromatografi kertas, sedangkan Zilliken (8) menggunakan teknik kromatografi gabungan antara teknik Kolom dan KLT. Untuk tujuan yang sama Murakami *et al.* (9) menerapkan teknik KCKT. Kelompok peneliti tersebut di atas menyimpulkan bahwa tempe mengandung genistein.

Selain untuk mengukur kadar genistein dalam tempe, penelitian ini juga bertujuan untuk mendapatkan genistein murni. Konsentrasi genistein ditetapkan secara spektrofotometri, sedangkan kromatografi kolom dan KLT diterapkan untuk mengisolasi genistein dari senyawa isoflavon lainnya yang ada dalam tempe serta untuk meningkatkan tingkat kemurnian isolat genistein. Teknik KCKT, Spektrofotometer dan Spektrometer Masa digunakan pada tahap identifikasi.

## PERCOBAAN

### Bahan

Hasil fermentasi kedele dengan *Rhizopus oligosporus* Saito (IMI 174457), pelat lapis tipis (Merck Silica-gel 60 yang mengandung indikator fluorescent F-254, tebal lapisan 2 mm) serta berbagai senyawa kimia bermutu *pro-analisis* telah digunakan pada penelitian ini.

### Alat

Peralatan ekstraksi (Soxhlet), *vacuum evaporator*, mesin KCKT (model Gilson seri 302), Spektrofotometer UV-Visible (Unicam LAMDA 5), Spektrometer (Kratos MS 80 RFA) dan alat-alat gelas.

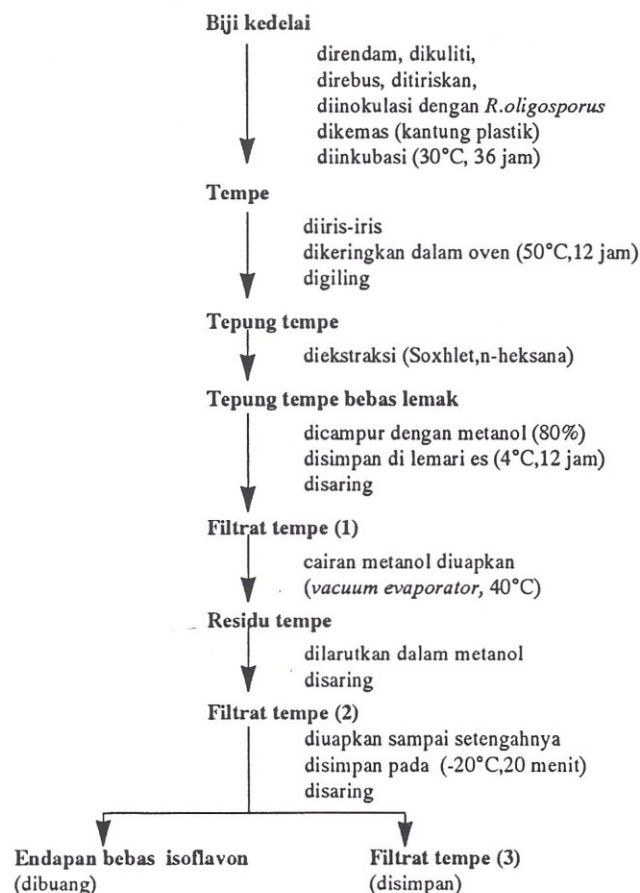
### Penyiapan Contoh

Kedelai kering (1 kg) direndam semalam dalam air (3 L) yang mengandung 0.01% asam asetat pada suhu ruang, untuk selanjutnya dikuliti, direbus (30 menit) dan ditiriskan. Kedelai (300-400g) kemudian diinokulasi dengan larutan spora *R. oligosporus* sebanyak 3 mL yang mengandung sekitar  $6 \times 10^6$  spora. Kacang hasil inokulasi dimasukkan ke dalam beberapa kantung plastik bening berlubang-lubang (20x30 cm), dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 36 jam. Sebelum digiling, tempe yang di-



peroleh diiris (0.5 x 3 cm) dan dikeringkan dalam oven (50°C, 12 jam).

Ekstraksi minyak dari tepung tempe (100g) dilakukan dalam peralatan Soxhlet dengan menggunakan *n*-heksana selama 3-4 jam. Tempe bebas lemak (30g) dicampur dengan campuran metanol-air (80% metanol, 20% air), lalu disimpan dalam lemari pendingin (4°C) semalam. Perbandingan antara tempe bebas lemak dan cairan metanol ini ialah 1:10. Campuran ini selanjutnya disaring, pelarutnya diuapkan di bawah tekanan rendah pada suhu sekitar 40°C. Residu yang tertinggal dilarutkan kembali dengan metanol murni (120 mL), bagian supernatan kembali diuapkan sampai setengahnya dan disimpan pada suhu -20°C selama 20 menit. Endapan yang terbentuk dianalisa kandungan isoflavonnya secara kromatografi (KLT, silika gel dalam campuran etil asetat-asam format-air dengan komposisi 10:2:3). Apabila hasil pengecekan menunjukkan bahwa isoflavon telah diekstraksi seluruhnya, endapan dibuang melalui penyaringan. Sedangkan bagian filtratnya diuapkan dan disimpan sampai diperlukan. Bagan penyip-an cuplikan adalah sebagai berikut :



#### Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Filtrat tempe (100 mg) dilarutkan dalam metanol (5 mL), lalu dibubuhkan pada pelat lapis tipis. Pelat-pelat ini dimasukkan ke dalam bejana pengembangan berisi campur-

an pelarut etil asetat-asam format (90%)-air (10:2:3). Kemudian pelat disinari dengan sinar ultra violet pada gelombang pendek (254 nm) dan panjang (365 nm) untuk mendeteksi adanya bagian yang berfluoresensi. Bagian yang berfluoresensi ini dikerok dan dielusi dengan metanol (2 x 2.5 mL). Eluat diuapkan dibawah tekanan rendah pada suhu 40°C, dan senyawa yang larut didalamnya dimurnikan secara KLT (eluen metanol-kloroform, 1:9) untuk kemudian diidentifikasi.

#### Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi (KCKT)

Contoh ekstrak tempe yang mengandung isoflavon dilarutkan dengan metanol (100 mL), lalu 20 µL diinjeksi-kan ke dalam mesin KCKT dengan menggunakan alat penyuntik Rheodyne (ukuran loop 20 µL). Pemisahan dilangsungkan pada kolom ODS-1 (octadecylsilyl silica-gel), dengan sistim gradien. Deteksi dilakukan dengan mengukur absorbansi sinar UV pada panjang gelombang 260 nm (Spectroflow 757 detector). Detector photodiode array PU 4120 (Phillips Analytical, Cambridge, England) yang diset pada daerah panjang gelombang 190-390 nm, digunakan untuk mengkonfirmasi identitas dari puncak yang sebelumnya telah diduga merupakan senyawa isoflavon. Data yang keluar dari detektor ini diolah lebih lanjut menggunakan komputer Dell System 310 (Dell Computer Corporation, USA) yang dilengkapi dengan program diode array PU 6003 (Phillips Analytical, Cambridge, England). Kecepatan pemisahan dari setiap analisis dipertahankan pada 1.0 mL/menit. Perubahan komposisi fasa gerak diatur dengan menggunakan dua buah pompa. Fasa gerak berupa pelarut A (97:3, air-asam asetat) dan pelarut B (97:3, metanol-asam asetat). Pada 5 menit pertama, fasa gerak berupa 100% pelarut A. Setelah itu, perbandingan pelarut B meningkat secara linier sampai 100% dalam jangka waktu 55 menit. Lima menit berikutnya, pelarut B dipertahankan pada tingkat 100%, lalu diturunkan sampai 0% selama periode 5 menit.

#### Kromatografi Kolom

##### Sephadex LH-20

Kolom terbuat dari gelas mula-mula dibilas dengan etanol, dikeringkan dan bagian lehernya ditutup dengan kapas, kemudian dibilas dengan beberapa milliliter pelarut *n*-propanol-etil asetat-air (5:5:1). Sephadex LH-20 yang dipilih sebagai fasa diam, mula-mula diaduk dengan campuran pelarut yang sama sebelum dituangkan ke dalam kolom. Berdasarkan percobaan pendahuluan, perbandingan optimum antara sampel dan fasa diamnya ialah 1:30.

Filtrat tempe (100 mg) dalam metanol (2 mL) dipisahkan melalui kolom yang telah disiapkan, dengan menggunakan fasa gerak diatas (8). Terdapat 7 fraksi eluat yang masing-masing banyaknya 25 mL dan semua fraksi ini dianalisa dengan cara KCKT.



### Aluminium oksida

Kolom berisi aluminium oksida (CAMAG, pH 6.5-7.5, ukuran partikel 100-240 mesh) digunakan untuk memisahkan senyawa isoflavon yang memiliki gugus hidroksil pada posisi kelima (misalnya genistein) dengan yang tidak (10). Karena genistein akan terikat pada fase diam, maka cairan metanol (50%) dituangkan kedalam kolom untuk mengelusi senyawa isoflavon lain yang terdapat pada filtrat tempe. Selanjutnya komponen yang terikat dapat dilepaskan dengan menambahkan eluen berupa metanol yang mengandung 4% HCl (10). Setelah menguapkan sebagian besar pelarut yang bersifat asam ini dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C, asam yang tertinggal dihilangkan dengan menambahkan 80% etanol (10 ml) untuk kemudian diuapkan kembali seluruhnya dengan cara yang sama.

Genistein yang terdapat dalam residu dilarutkan dengan etil asetat; setelah pelarutnya diuapkan, genistein dilarutkan kembali dalam metanol. Kromatografi dilakukan pada pelat silika (ketebalan 2 mm), dengan campuran kloroform-metanol (20:3) sebagai fasa geraknya. Bagian yang berfluoresensi dielusi dengan metanol untuk dimurnikan lebih lanjut dengan KLT dalam eluen etil asetat-asam format (90%)-air (10:2:3).

### Identifikasi

Analisa spektrum dari setiap senyawa isoflavon yang telah dimurnikan dilakukan dengan spektrofotometer UV-Visible (Unicam LAMDA 5). Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 200-400 nm, dengan menggunakan pelarut metanol, campuran metanol dengan natrium hidroksida, metanol dengan natrium asetat, metanol dengan natrium asetat dan asam borat serta metanol dengan aluminium klorida (11).

Warna khas akan terbentuk bila pelat silika yang mengandung isoflavon disemprot dengan reagen tertentu seperti Gibbs atau dengan *diazotised p-nitroaniline* (12).

Dalam prosedur hidrolisis, komponen tempe yang telah dimurnikan (masing-masing 1 mg) dilarutkan dalam metanol, kemudian ditambahkan HCl 2N sebanyak 2 mL. Campuran ini dipanaskan dalam penangas air selama 30-40 menit pada suhu 100°C. Selama pemanasan, metanol ditambahkan agar volume campuran tidak berubah. Diakhir hidrolisis, isi campuran dikurangi sampai 1 mL dan air (3-5 mL) ditambahkan. Setelah dingin, dilakukan ekstraksi dengan etil asetat (3 kali, masing-masing sebanyak 5 mL). Ekstrak yang diperoleh dikeringkan (tekanan rendah, 40°C) sebelum dianalisa (KLT, silika gel dalam sistim pelarut kloroform-metanol=4:1), bersamaan dengan beberapa standar senyawa gula (xilosa, glukosa, fruktosa dan sukrosa).

Spektrum masa genistein ditetapkan pada alat spektrometer.

### Kuantifikasi

Konsentrasi genistein dalam tempe ditentukan secara spektrofotometri. Isolat genistein yang telah dimurnikan

sebelumnya, dilarutkan dalam sejumlah tertentu metanol (D), kemudian diukur harga absorbansinya pada panjang gelombang 263 nm. Konstanta (C) untuk genistein (7.3) diperoleh dengan cara menurunkan harga koefisien ekstingsi (E) yang telah dilaporkan sebelumnya oleh Ollis (13) yaitu sebesar 37153 pada panjang gelombang yang sama. Selanjutnya perhitungan menggunakan rumus dibawah ini :

$$E(\text{genistein}) : 1000 = B$$

$$\text{Berat Molekul (genistein)} : B = C$$

$$\text{Kadar genistein } (\mu\text{g}) = A \times D \times C$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Dengan menerapkan teknik KLT, isoflavon dalam filtrat tempe dapat dipisahkan menjadi beberapa pita. Empat buah pita utama, yaitu yang memiliki Rf 0.93 (senyawa T-I), Rf 0.89 (T-II), Rf 0.52 (T-III) dan Rf 0.45 (T-IV) diamati lebih mendalam. Penampilan keempatnya pada pelat silika setelah disinari sinar UV, sebelum dan setelah diasapi dengan uap amonia, serta warna yang dihasilkannya setelah penyemprotan dengan reagen kromogenik disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Respon isoflavone tempe terhadap penyinaran (UV) dan penyemprotan (reagen kromogenik)

Senyawa	Fluoresensi (pada 365nm)	Jenis Reagen	
		Gibbs	<i>p</i> -nitroaniline
T-I	ungu tua	biru keunguan	kuning
T-II	biru muda	negatif	coklat muda
T-III	ungu tua	biru keunguan	kuning
T-IV	tak tercatat	negatif	coklat muda

Warna ungu tua yang berfluoresensi serta tidak dipengaruhi oleh uap amonia (seperti yang ditunjukkan oleh senyawa T-I dan T-III), merupakan tanda khusus bagi isoflavon yang memiliki gugus hidroksil pada posisi kelima dari struktur molekulnya (14). Hasil reaksi dengan reagen *p*-nitroanilin menunjukkan bahwa keempatnya termasuk ke dalam golongan fenol.

Tahap identifikasi, kemudian dilanjutkan dengan mengukur spektrum serapannya. Menurut Horowitz dan Jurd (15), isoflavon seringkali dapat dikenali dari spektranya yang berbentuk khas. Dalam metanol, penyerapan terkuat terjadi disekitar panjang gelombang antara 250 dan 270 nm (puncak kedua), disertai tonjolan yang intensitasnya relatif lebih rendah pada daerah 300 dan 330 nm (puncak pertama).

Dari Tabel 2 dan Gambar 1, dengan jelas dapat diketahui bahwa keempat senyawa ini mempunyai serapan tertinggi sesuai dengan yang diberikan oleh isoflavon. Absorbansi maksimum senyawa T-I dan T-III sama dengan yang dilaporkan sebelumnya untuk genistein dan turun-



annya genistin (16). Berdasarkan data ini, identifikasi yang lebih terarah hanya dilakukan terhadap senyawa dengan kode T-I dan T-III.

Tabel 2. Spektra uv dari isoflavone dalam tempe.

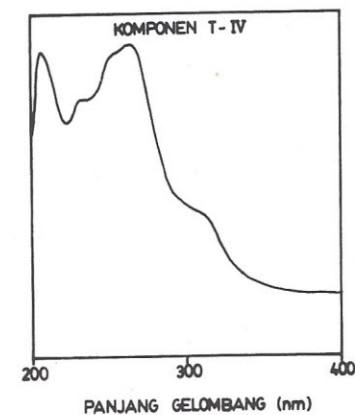
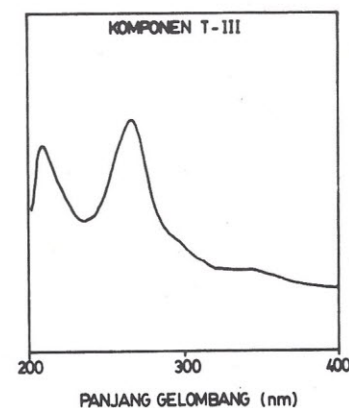
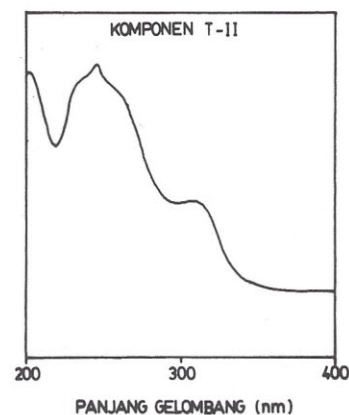
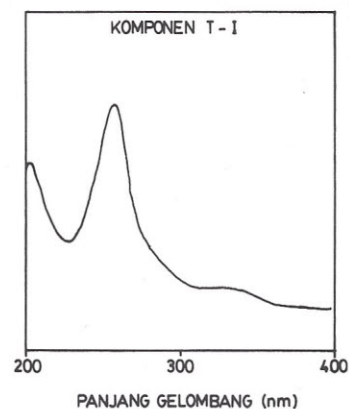
Senyawa	Panjang gelombang maksimum (nm) dalam metanol
T-I	261, 324
T-II	248, 301
T-III	261, 328
T-IV	250, 259, 306

Dalam campuran metanol dan natrium hidroksida (Tabel 3), puncak kedua (dalam metanol) dari kedua komponen ini bergeser sebesar 13 dan 8 nm. Hal ini menunjukkan bahwa masing-masing memiliki paling sedikit satu gugus hidroksil pada struktur molekulnya. Meskipun demikian, dalam metanol yang mengandung natrium asetat, hanya senyawa T-I yang mengalami pergeseran. Menurut Williams dan Harborne (12) dari data ini dapat diketahui bahwa T-I merupakan senyawa isoflavon yang mempunyai gugus hidroksil pada atom karbonnya posisi 7. Sebaliknya, bahan kimia yang sama tidak menimbulkan pergeseran pada senyawa T-III, sehingga dapat disimpulkan bahwa C-7 mengalami derivatisasi. Hal serupa dapat dilihat pada penambahan aluminium klorida, serapan maksimum senyawa T-I dan T-III bergeser sampai 11 nm, sesuai dengan yang diperkirakan untuk isoflavon dengan gugus hidroksil pada karbon posisi-5 (15). Berdasarkan data UV di atas serta kurva penyerapan dalam pelarut metanol, dapat disimpulkan bahwa T-I dan T-III masing-masing identik dengan genistein dan genistin.

Tabel 3. Pergeseran panjang gelombang penyerapan maksimum (nm)

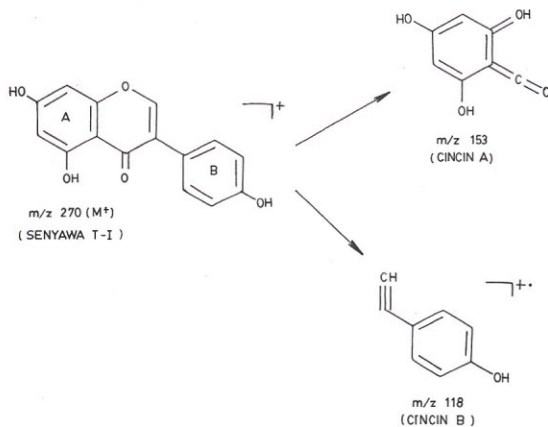
Pelarut	Senyawa T-I	Senyawa T-III
Metanol (MeOH)	261	261
MeOH+natrium hidroksida	274	269
MeOH+aluminium klorida	272	272
MeOH+natrium asetat (jenuh)	270	261
MeOH+natrium asetat+asam borat	261	260

Hasil hidrolisa menunjukkan bahwa komponen T-I tidak mengalami perubahan, berbeda dengan T-III yang memberikan noda berwarna kuning tua (sesuai dengan reaksi yang diberikan glukosa) setelah penyemprotan dengan reagen naftoresorsinol.

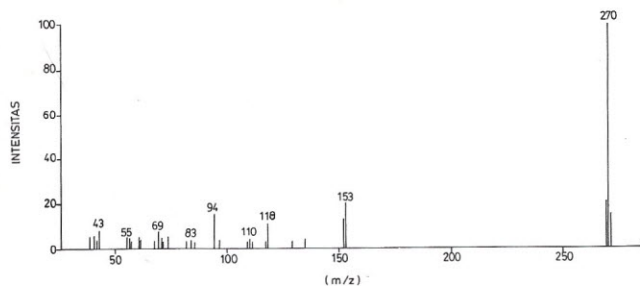


Gambar 1. Spektra UV isoflavon tempe. (Komponen T-I, Komponen T-II, Komponen T-III, Komponen T-IV)

Untuk lebih meyakinkan bahwa komponen T-I benar merupakan genistein, dilakukan analisa dengan spektrometri massa. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa pada spektrum T-I (Gambar 2) dapat dilihat adanya *molecular ion* dengan  $m/z$  270 ( $C_{15}H_{10}O_5$ ), serta fragmen yang lebih kecil pada  $m/z$  153 dan 118, keduanya mewakili cincin A dan B seperti terlihat pada Gambar 3.

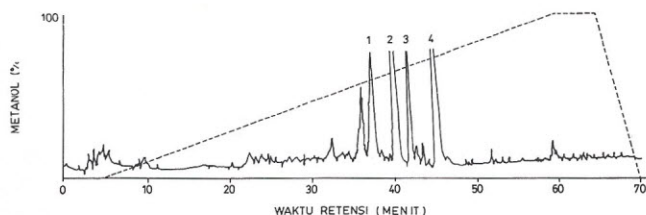


Gambar 2. Fragmen-fragmen hasil perpecahan genistein.

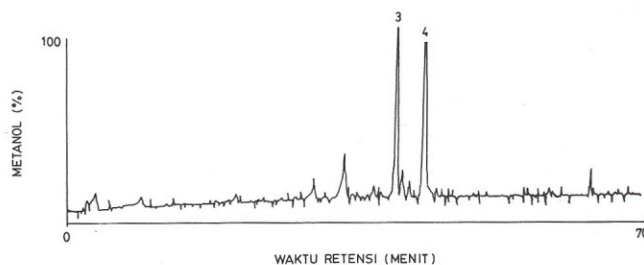


Gambar 3. Spektrum massa senyawa T-I.

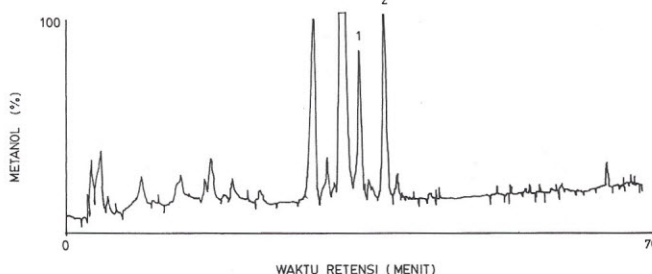
Teknik kromatografi yang lebih sensitif, KCKT, juga dicoba untuk mengisolasi genistein. Seperti terlihat pada Gambar 4, kromatogram dari filtrat tempe menunjukkan adanya beberapa puncak. Dengan menggunakan alat *deteksi diode array* dan senyawa standar isoflavon, empat puncak dapat diidentifikasi, yaitu puncak pertama merupakan daidzin, berturut-turut diikuti dengan genistin, daidzein dan genistein.



Gambar 4 Kromatogram isoflavon dalam ekstrak tempe. Puncak 1=daidzin, 2=genistin, 3=daidzein dan 4=genistein.



Gambar 5. Kromatogram isoflavon dalam tempe (Gabungan fraksi kolom 1-4).



Gambar 6. Kromatogram isoflavon dalam tempe (Gabungan fraksi kolom 5-7).

Karena terbatasnya jumlah cuplikan yang dapat dipisahkan melalui teknik KCKT, dirasa sangat sulit untuk mendapatkan genistein murni dalam jumlah cukup untuk dianalisa lebih lanjut, sehingga dicoba melakukan penggabungan antara teknik kromatografi kolom dan lapis tipis. Kolom gelas dengan fasa diam Sephadex LH-20 mula-mula digunakan untuk memisahkan glukosida isoflavon dari aglikonnya. Selanjutnya senyawa yang terdapat pada kedua fraksi ini dipisahkan pada pelat silika.

Seperti dapat dilihat pada Gambar 5, setelah dilewatkan pada kolom Sephadex, fraksi aglikon daidzein dan genistein dari ekstrak tempe dielusi lebih awal. Hasil analisa secara KCKT selanjutnya menunjukkan bahwa glukosida daidzin dan genistin berada pada fraksi berikutnya (Gambar 6).

Meskipun kedua kromatogram ini menunjukkan bahwa Sephadex berguna dalam pemisahan isoflavon dalam ukuran sampel yang lebih besar, namun genistein masih harus dipisahkan dari daidzein. Cara yang telah diterapkan untuk mencapai tujuan ini ialah KLT pasta silika gel, dan fasa gerak kloroform-metanol (9:1).

## KESIMPULAN

Berbagai teknik kromatografi dapat digunakan untuk memisahkan isoflavon dalam tempe. Pada percobaan ini isolasi genistein dapat dilakukan dengan hanya menerapkan teknik kromatografi lapis tipis yang kemudian dapat diikuti dengan mengukur kadarnya secara spektrofotometri.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Percobaan ini merupakan salah satu bagian dari tesis PhD penulis pada Universitas Reading, U.K. Untuk itu penulis sangat berterima kasih kepada Dr.J.L.Ingham atas



bimbingannya selama percobaan ini dilakukan. Makalah ini telah dipresentasikan pada Seminar Nasional Himpunan Kimia Indonesia di Depok pada tanggal 27-29 Juli 1993 atas dukungan Puslitbang Kimia Terapan, LIPI.

## PUSTAKA

1. H.M.Drane, D.S.P.Patterson, B.A.Roberts and N.Saba. Oestrogenic activity of soyabean products. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 18:425.(1980)
2. M.Naim, B.Gestetner, A.Bondi and Y.Birk. Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. *J.Agric.Fd. Chem.* 24:1174. (1974)
3. E.D.Walter. Genistin (an isoflavone glucoside) and its aglycone, genistein from soybeans. *J.Am.Chem.Soc.* 63:3273. (1941)
4. A.M.Nash, A.C.Eldridge. and W.J.Wolf. Fractionation and characterization of alcohol extractables associated with soybean proteins. Nonprotein components. *J.Agric.Fd. Chem.* 15:102. (1967)
5. A.Seo and C.V.Morr. Improved high-performance liquid chromatographic analysis of phenolic acids and isoflavonoids from soybean protein products. *J. Agric. Fd. Chem.* 32:530. (1984)
6. E.Farmakalidis and P.A.Murphy. Isolation of 6'-O-acetylgenistin and 6'-O-acetylgenistin from toasted defatted soyflakes. *J.Agric.Fd. Chem.* 33:385.(1985)
7. P.György, K.Murata and H.Ikehata. Antioxidants isolated from fermented soybeans (tempeh). *Nature.* 203:870.(1964)
8. F.W.Zilliken. Isoflavones and related compounds, method of preparing and using and antioxidant compositions containing same. US Patent No.4,366,082. (1982)
9. H.Murakami, T.Asakawa, J.Terao and S.Matsushita. Antioxidative stability of tempeh and liberation of isoflavones by fermentation. *Agric.Biol.Chem.* 48:2971. (1984)
10. L.C.Wang. Separation of soybean isoflavones from their 5-hydroxy derivatives by thin-layer chromatography. *Anal.Biochem.* 42:296. (1971)
11. K.R.Markham. "Techniques of Flavonoid Identification". Academic Press, London. (1982)
12. C.A.Williams and J.B.Harborne. Isoflavonoids. In: "Methods in Plant Biochemistry". P.M.Dey and J.B.Harborne (eds.). Vol.1. Academic Press, London. 421. (1989)
13. W.D.Ollis. The flavonoids. In: "The Chemistry of Flavonoid Compounds". T.A.Geissman (ed.). Pergamon Press, Oxford. 353. (1962)
14. T.J.Mabry, K.R.Markham and M.B.Thomas. "The Systematic Identification of Flavonoids". Springer, Berlin.(1970)
15. R.M.Horowitz and L.Jurd. Spectral studies on flavonoid compounds. II.Isoflavones and flavanones. *J.Org.Chem.* 26:2446. (1961)
16. N.Ohta,G.Kuwata, H.Akahori and T.Watanabe. Isolation of a new isoflavone acetylglucoside,6"-O-acetylgenistin, from soybeans. *Agric.Biol.Chem.* 44:469. (1980)

## INFORMASI TRAINING 1994/1995 Diselenggarakan oleh: Puslitbang Kimia Terapan-LIPI, Bandung

No.	Tanggal	Topik Kursus	Angkatan Ke:
1.	3-11 Mei 1994	Teknik Analisa Cemarkan Kimia dalam Air Limbah Industri	8
2.	25-29 Juli 1994	International Training of Advanced Capillary Column Gas Chromatography	2
3.	6-16 September 1994	Teknik Analisa Kimia Instrumental dan Aplikasinya	13
4.	18-26 Oktober 1994	Teknik Analisa Cemarkan Kimia dalam Air Limbah Industri	9
5.	6-14 Desember 1994	Teknik Pengolahan Limbah Cair Industri secara Fisika, Kimia & Biologi	3
6.	17-26 Januari 1995	Teknik Analisa Debu dan Gas Berbahaya dalam Udara	1
7.	April 1995	Teknik Dasar Analisa Kimia	2
8.	Juni 1995	Teknik Analisa Cemarkan Kimia dalam Air Limbah Industri	10
9.	Agustus 1995	Teknik Analisa Kimia Instrumental dan Aplikasinya	14
10.	Oktober 1995	17th International Symposium on Capillary Chromatography (+ Training)	2
11.	Desember 1995	Teknik Pengolahan Limbah Cair Industri secara Fisika, Kimia & Biologi	4